

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 26 日現在

機関番号：85402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：23791486

研究課題名（和文） 肝移植後シアストレスによる肝由来免疫寛容性の破綻機構の解明と拒絶制御への応用

研究課題名（英文） Postoperative portal hypertension promotes alloimmune responses in recipients after LDLT by impairing antigen presenting capacity of LSECs under shear stress.

研究代表者

尾上 隆司（ONOE TAKASHI）独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）

研究者番号：90549809

研究成果の概要（和文）：

生体肝移植では肝グラフト血行動態が移植後の肝機能に大きく影響を与える。我々の施設で行われた生体肝移植症例での検討で、肝移植後門脈圧亢進症例では拒絶が有意に多く、門脈圧亢進は免疫にも影響を与えている可能性が示唆された。肝内免疫細胞のうち、肝類洞内皮細胞は免疫寛容性を、樹状細胞は主に免疫原性をもつことが知られており、門脈圧亢進下の肝グラフト免疫に関し、これらの細胞に注目して解析を行った。まず 70%肝切除マウスを用いた門脈圧亢進モデルを確立した。肝切後 3 日目に肝構成細胞を stimulator として同種リンパ球混合試験を行ったところ、肝切群は無処置群と比べ T 細胞の有意な同種反応亢進を認めた ( $p < 0.05$ )。一方、予めシャントを作成した肝切群では同種反応の亢進は認めず、門脈圧亢進による拒絶惹起がマウスモデルでも示された。そこで上述の 70%肝切除マウスにおける肝切後 3 日目の肝類洞内皮細胞のフェノタイプ解析を行ったところ、肝切群では肝類洞細胞のクラス II 表出の有意な低下 ( $p < 0.01$ ) を認めたのに対し、シャント肝切群では有意な低下を認めなかった。一方、肝樹状細胞は肝切群でもフェノタイプの有意な変化を認めなかった。この事よりシアストレス下では類洞内皮細胞がその抗原提示能を喪失し、結果、肝臓の同種反応性 T 細胞に対する免疫寛容性が低下し拒絶反応が惹起されることが示唆された。さらに臨床において過小グラフト症例に対し血管拡張剤である PGE1 門脈注入療法を行った症例では、術後門脈圧が低下し抗ドナー反応も有意に抑制された。これらの結果より、肝移植後の門脈圧コントロールは肝由来免疫寛容性保持および拒絶反応抑制に重要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that portal hypertension leads to liver sinusoid cells including liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), which are supposed to have tolerogenic capacity. We found that the incidence of acute rejection episode was significantly higher in portal hypertension patients after living-donor liver transplantation (LDLT). This fact prompted us to investigate the influence of postoperative portal vein pressure (PVP) on alloimmune response in recipient after LDLT. To investigate mechanism, we performed allogeneic co-culture assay using 70% hepatectomized (HTx) mouse model with or without porto-systemic shunt. In this assay, 3 days after HTx, digested whole hepatic constituent cells (HCs) of Balb/c mice were co-cultured with allogeneic B6 splenocytes, and B6 T-cell proliferation was quantified. Further, we performed phenotypic analysis of the LSECs and dendritic cells in the livers of these mice. The co-culture assay revealed that Balb/c HCs from HTx mice without shunt induced a significantly higher anti-Balb/c response of B6 T cells than those from untreated mice. However, this accelerated B6 T-cell response was significantly reduced in HTx mice with shunt. Phenotypic analysis revealed that LSECs from HTx mice without shunt significantly down-regulated their expressions of MHC class II, while those from Htx mice with shunt recovered their expression of MHC class II. The phenotype of dendritic cells showed no significant change. These results suggest that postoperative portal hypertension promotes alloimmune responses in recipients after LDLT, at least in part, by impairing antigen presenting capacity of LSECs. We then applied a continuous portal infusion of prostaglandin E1 (PGE1) for portal decompression to the treatment of LDLT recipients with small-for-size grafts and investigated the impact of this treatment on post-operative alloimmune responses in patients. The

temporal portal infusion of PGE1 significantly attenuated portal hypertension as well as anti-donor T cell responses and clinical rejection

In conclusion, our findings present a novel concept to prevent an acceleration of alloimmune responses by controlling portal vein pressure after LDLT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 24 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：シアストレス、類洞内皮細胞、抗原提示、免疫寛容

### 1. 研究開始当初の背景

生体肝移植では肝グラフト血行動態が移植後の肝機能に大きく影響を与える。特に、過小グラフトの様に相対的に門脈血流が過大となる場合には、門脈圧が亢進し、シアストレスによる類洞内皮細胞障害が起こることが知られている。臓器移植において肝臓は、他の臓器と比べ免疫寛容を誘導しやすい臓器として知られおり、我々はその一機序として肝類洞内皮細胞が免疫寛容性を持ち、クラス II 抗原や CD80/86 分子、Fas-L や PD-L1 といったアポトーシス分子を表出し抗原提示を行うことでドナー抗原反応性 T 細胞を寛容化し、拒絶反応を抑制する事を明らかにしてきた。しかし門脈圧亢進下では類洞内皮細胞障害により肝臓のもつ免疫学的寛容性が大きく変化する可能性が十分に考えられる。我々の検討では肝移植における肝グラフト移植後の門脈圧が亢進している患者の予後は有意に不良であり、術後の抗ドナー反応亢進および拒絶反応を高率に認めた。この事実は門脈圧上昇により拒絶反応が惹起されている可能性を示している。

### 2. 研究の目的

以上、これまでの研究結果から、過小グラフトを用いた肝移植では、グラフトに流入する相対的過剰門脈血流増大に起因する門脈圧亢進によるシアストレス増大により類洞内皮細胞の性質・機能が変化し、類洞内皮細胞を含む肝由来免疫寛容性が喪失している可能性が示唆された。本研究では、門脈圧亢進下での肝グラフト内の免疫学特性に関して、門脈圧亢進と類洞内皮細胞やその他の免疫担当細胞の関係に注目して、そのメカニズムの解明と臨床応用を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 70%肝切除マウスモデルを用いた門脈圧亢進と肝グラフトの免疫原性変化の関

### 連の検討

#### ①門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝臓免疫原性の検討

過小グラフト肝移植後の門脈圧亢進状態を再現する目的で 70%肝切除マウスモデルを確立した。Balb/c マウスに 70%肝切除を行い 3 日後に、B6 マウス脾細胞を responder、コラゲナーゼ灌流法により採取した Balb/c マウス肝構成細胞を stimulator として用いた同種リンパ球-肝構成細胞混合試験 (MHLR) により、門脈圧亢進状態の肝臓に対する同種 T 細胞反応を解析、無処置群と比較した。さらに門脈圧亢進を解除する目的で、肝切除前に脾臓の皮下埋め込みによるシャント作製を行い、同様の解析を行った。

#### ②門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝類洞内皮細胞のフェノタイプ変化の検討

肝切除後 3 日目にコラゲナーゼ灌流法により採取した Balb/c マウス肝構成細胞から類洞内皮細胞を磁気ソーティング法により濃縮し、抗原提示に関与する MHC class I、class II、CD40、CD80、CD86 およびアポトーシス誘導分子である PD-L1 の表出をフローサイトメーターで解析し、無処置マウスおよびシャント作製後肝切除マウスと比較した。

#### ③門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝樹状細胞のフェノタイプ変化の検討

②と同様に肝切除後 3 日目にコラゲナーゼ灌流法により採取した Balb/c マウス肝構成細胞から類洞内皮細胞を磁気ソーティング法に除去し、CD11b-CD11c+ lymphoid DC、CD11b+CD11c+ myeloid DC、CD11b-CD11cdim plasmacytoid DC の肝内樹状細胞各サブセットについてフェノタイプ解析し、無処置マウスおよびシャント作製後肝切除マウスと比較した。

(2) 臨床過小グラフト肝移植における、門脈圧減圧を目的とした PGE1 持続門脈注入療法

①PGE1 持続門脈注入療法による門脈圧減圧効果の検討

GRWR (graft -recipient-weight ratio) が 0.72 以下の過小グラフト生体部分肝移植症例 5 例に対して、倫理委員会および本人承認のもと、術中から術後一週間まで径門脈的 PGE1 持続注入療法による門脈圧減圧療法を行った。開腹後、門脈カテーテルを挿入し、開腹時、手術終了時の門脈圧を測定した (PG 群)。比較対照として、同療法導入以前の生体部分肝移植 0.72 以下の過小グラフト症例 8 例を、類似対照症 (historical control) として抽出、retrospective に検討した (non-PG 群)。これら 2 群間の背景因子 (レシピエント因子、ドナー因子、手術因子) には有意差を認めなかった。また同療法導入前後の検討対象期間内の免疫抑制プロトコールは同一であり、また生存率も同等であった。

②PGE1 持続門脈注入療法の拒絶反応に対する効果の検討

当施設では、CFSE 色素を用いた混合リンパ球試験 (CFSE-MLR) により術後定期的に抗ドナー反応を定量する免疫モニタリングを行っている。レシピエントの末梢血単核球を分離し、CFSE で染色した後、放射線照射したドナー末梢血単核球を stimulator として混合培養を行い、5 日目にフローサイトメーターで T 細胞の増殖および活性化 (CD25 陽性率) で定量した。術後 2-4 週後の CFSE-MLR の結果を抽出し検討を行った。

4. 研究成果

(1) 70% 肝切除マウスモデルを用いた門脈圧亢進と肝グラフトの免疫原性変化の関連の検討

①門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝臓免疫原性の検討

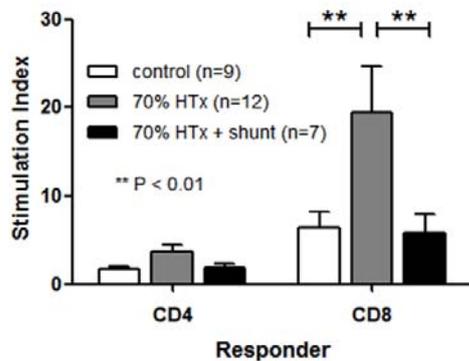


図 1. マウス肝構成細胞に対する、同種 T 細胞反応 (CD4T 細胞および CD8T 細胞)

CD4 の S. I. は無処置群、肝切群、肝切+シャント群でそれぞれ  $1.77 \pm 0.35$ ,  $3.77 \pm 0.64$ ,  $1.92 \pm 0.49$  であり、肝切群で他群に比べ高い傾向にあった。CD4 の S. I. は無処置群、肝切群、肝切+シャント群でそれぞれ  $6.44 \pm 1.71$ ,  $19.45 \pm 5.29$ ,  $5.73 \pm 2.14$  であり、肝切群で無処置群に比べ有意に亢進しており、さらに肝切+シャント群では亢進した反応が有意に抑制されていた ( $p < 0.01$ )。

②門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝類洞内皮細胞のフェノタイプ変化の検討

無処置群の肝類洞内皮細胞は従来の報告の通り、MHC class I, class II を表出し、CD40 および CD80 分子を弱く発現していた。また PD-L1 の発現を認めた。これに対し、肝切群の類洞内皮細胞は MHC class II の発現が著明に減弱していた。その他の MHC class I、副刺激分子、PD-L1 分子の表出は変化を認めなかった。MHC class II 表出減弱は肝切除後 14 日間持続した。肝切+シャント群では無処置群と比べこれらのフェノタイプに統計学的変化は認めなかったが、MHC class II 分子の表出は肝切群よりも高い傾向にあった。

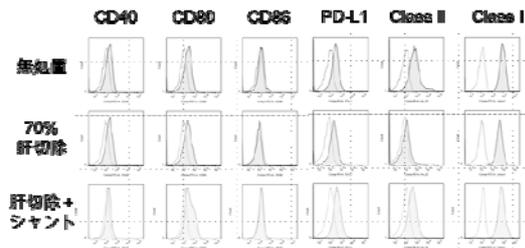


図 2. マウスの類洞内皮細胞表面抗原プロファイル

③門脈圧亢進時および門脈圧亢進解除後の肝樹状細胞のフェノタイプ変化の検討

CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> lymphoid DC、CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> myeloid DC、CD11b-CD11c<sup>dim</sup> plasmacytoid DC の肝内樹状細胞各サブセットでの検討では、いずれのサブセットでも MHC class I, class II を含むフェノタイプの有意な変化を認めなかった。

(2) 臨床過小グラフト肝移植における、門脈圧減圧を目的とした PGE1 持続門脈注入療法

①PGE1 持続門脈注入療法による門脈圧減圧効果の検討

Non-PG 群の手術終了時門脈圧は  $20.5 \pm 1.47$  mmHg で門脈圧亢進状態であったのに対し、PG 群の手術終了時門脈圧は  $15.4 \pm 1.17$  mmHg であり、有意に低い値であった ( $p < 0.005$ )。さらに手術開始時と手術終了時の門脈圧比は、Non-PG 群、PG 群それぞれ  $0.99 \pm 0.06$  と  $0.62 \pm 0.04$  であり、PGE1 持続門脈注入療法によ

る有意な門脈減圧効果が示された ( $p < 0.001$ )。

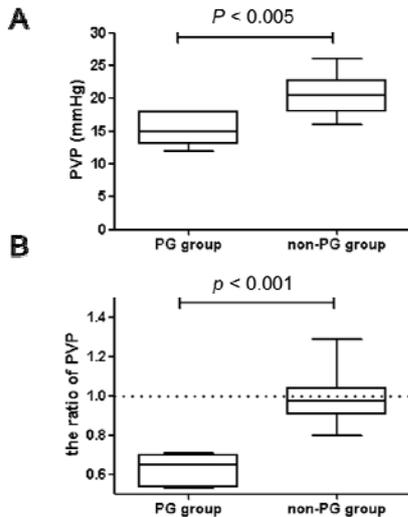


図 3.

- (A) 手術終了時門脈圧 (PVP, mmHg)  
 (B) 手術終了時門脈圧/開腹時門脈圧 (比)

②PGE1 持続門脈注入療法の拒絶反応に対する効果の検討

Non-PG 群の術後 2-4 週後の抗ドナーCD8T 細胞反応は SI が  $2.85 \pm 0.50$ 、増殖 CD8T 細胞中の活性化 CD25 陽性 T 細胞の存在率  $63.82 \pm 8.63\%$  であり、抗ドナー反応の亢進を認めた。一方、PG 群の術後 2-4 週後の抗ドナーCD8T 細胞反応は SI が  $1.10 \pm 0.13$ 、増殖 CD8T 細胞中の活性化 CD25 陽性 T 細胞の存在率  $9.24 \pm 5.93\%$  であり、Non-PG 群と比べ抗ドナー反応の有意な抑制を認めた (それぞれ  $p = 0.009$ 、 $p < 0.001$ )。

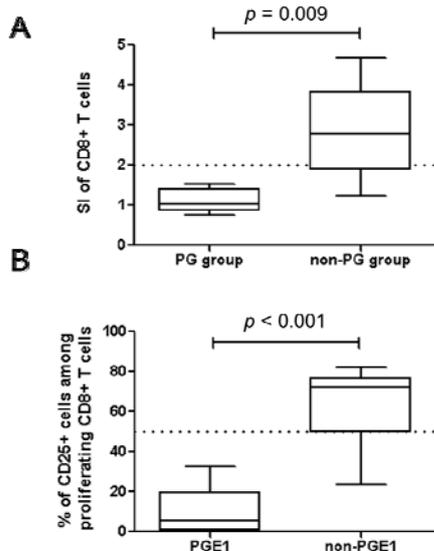


図 4. 術後 2 週後の抗ドナー反応

- (A) CD8 細胞増殖係数 (S. I.)  
 (B) CD8 細胞中活性化細胞比率 (%)

さらに臨床的拒絶反応の検討では、Non-PG 群 8 例中 3 例に強い急性拒絶、1 例に慢性拒絶を認めたのに対し、PG 群 5 例中全例で拒絶反応を認めなかった。

以上の結果より、肝移植後門脈圧亢進により拒絶が惹起されている可能性が示唆された。また、門脈圧減圧により抗ドナー反応亢進が抑制されたことより、臨床肝移植、特に過小グラフトを用いた肝移植における門脈圧コントロールの重要性が示された。門脈圧亢進下では、肝由来免疫寛容性を担う類洞内皮細胞の抗原提示能低下により免疫寛容性が低下する一方、樹状細胞の抗原提示能は変化せず免疫原性を維持することが拒絶惹起メカニズムの一つであることが示唆されたが、類洞内皮細胞の抗原提示能低下機序に関しては、引き続き検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Onoe T., Tanaka Y., Ide K., Ishiyama K., Oshita A., Kobayashi T., Amano H., Tashiro H., and Ohdan H., Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. *Transplantation*, 95(12):1521-1527. 2013
2. Tashiro H., Ide K., Amano H., Kobayashi T., Onoe T., Ishiyama K., Kuroda S., Tazawa H., Kono H., Aikata H., Takahashi S., Chayama K., and Ohdan H., Surgical treatment for portosystemic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: Occlusion of portosystemic shunt in combination with splenectomy. *Hepatol Res.* 43(3):249-54. 2013
3. Banshodani M., Onoe T., Shishida M., Tahara H., Hashimoto S., Igarashi Y., Tanaka Y., and Ohdan H., Adoptive Transfer of Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Specifically Inhibits T Cell Responses to Cognate Stimuli. *Cell Transplant.* 2012 Epub ahead of print
4. Tanaka Y., Tashiro H., Onoe T., Ide K., Ishiyama K., and Ohdan H., Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and

mortality in living donor liver transplant recipients. Transplant Proc. 44(2):555-9. 2012

5. Yanai H., Chiba S., Ban T., Nakaima Y., **Onoe T.**, Honda K., Ohdan H., and Taniguchi T., Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). Proc Natl Acad Sci U S A. 108(28):11542-7. 2011

〔学会発表〕（計 14 件）

1. **Onoe T.**, Hashimoto S, Tanaka Y, Ohdan H., The Impact and Mechanism of Postoperative Portal Hypertension on Alloimmune Responses After
2. Living Donor Liver Transplantation. (Rising Star Award, The ILTS 19th Annual International Congress, 2013.6.12-15, Sydney, Australia)
3. Hashimoto S, **Onoe T.**, Tanaka Y, Ohdan H., Liver Sinusoidal Endothelial Cells of Small-for-Size Grafts Lose Their Immunosuppressive Function Against Allogeneic T Cells. (American Transplantation Congress 2012, 2012.6.2-6, Boston, USA)
4. Tanaka Y, **Onoe T.**, Hashimoto S, Ohdan H. et al., Impact of postoperative portal hypertension on alloimmune responses after living donor liver
5. transplant. (24th International congress of the transplantation society, 2012.7.15-19, Berlin, Germany)
6. **Onoe T.**, Hashimoto S, Tanaka Y, Ohdan H. et al., Continuous portal infusion of PGE1 attenuates portal hypertension and alloimmune responses in
7. adult-to-adult living donor liver transplantation. (Congress of Asia Society of Transplantation 2011, 2011.9.25, Seoul, Korea)
8. **Onoe T.**, Hashimoto S, Tanaka Y, Ohdan H. et al., Continuous PGE1 injection via the portal vein for small-for-size graft improves graft function and
9. survival in adult-to-adult living donor liver transplantation. (American Transplant Congress 2011, 2011.4.30, Philadelphia, USA)

10. 橋本慎二, **尾上隆司**, 田中友加, 大段秀樹 他, 肝過小グラフトにおける免疫応答亢進メカニズムの解析 (第 39 回日本臓器保存生物医学学会学術集会, 平成 24 年 11 月 16-17 日, 福島)
11. 橋本慎二, **尾上隆司**, 田中友加, 大段秀樹 他, 門脈圧亢進下での拒絶反応更新メカニズムの解析 (第 48 回日本移植学会総会, 平成 24 年 9 月 20-22 日, 名古屋)
12. 橋本慎二, **尾上隆司**, 田中友加, 大段秀樹 他, 過小グラフトにおける肝由来免疫寛容性の解析 (第 30 回日本肝移植研究会, 平成 24 年 6 月 14-15 日, 福岡)
13. **尾上隆司**, 橋本慎二, 田中友加, 大段秀樹 他, 過小グラフトを用いた生体部分肝移植に対する PGE 門脈持続注入療法の有用性の検討 (第 29 回日本肝移植研究会, 平成 23 年 7 月 21 日, 仙台)
14. **尾上隆司**, 橋本慎二, 田中友加, 大段秀樹 他, 生体部分肝移植後の PGE1 門脈注入療法を用いた過小グラフト症候群治療の検討 (第 111 回日本外科学会定期学術集会, 平成 23 年 5 月 26 日, 東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾上 隆司 (ONOE TAKASHI)  
独立行政法人 国立病院機構  
呉医療センター・中国がんセンター  
臨床研究部 研究室長  
研究者番号 : 90549809

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :